

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2004/108272
PCT/JP2004/008364

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

ASAHI, Kazuo
Nishi-Shinbashi Noa Bldg. 4th Floor
18-9, Nishi-Shinbashi 1-chome
Minato-ku, Tokyo 105-0003
JAPON

Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 16 December 2004 (16.12.2004)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference PTX-37-PCT			
International application No. PCT/JP2004/008364	International filing date (<i>day/month/year</i>) 09 June 2004 (09.06.2004)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 09 June 2003 (09.06.2003)	
Applicant PENTAX CORPORATION et al			

The International Bureau transmits herewith the following documents:

- ☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 16 December 2004 (16.12.2004) under No. WO 2004/108272
- ☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (*as the case may be*) on the front page of the attached document.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Masashi Honda

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 70 10

明細書

吸着剤、吸着装置および吸着装置の製造方法

技術分野

本発明は、吸着剤、吸着装置および吸着装置の製造方法に関するものである。

背景技術

タンパク質研究の分野においては、タンパク質の構造や機能を解析する手法として、cDNAを用いてタンパク質を多量に発現させ、得られたリコンビナントタンパク質を分離・精製することが行われている。

また、遺伝子によって翻訳されたタンパク質はリン酸化、糖鎖の付加のように種々の修飾を受け、その機能が調節される。この翻訳後の修飾は、細胞内情報伝達、細胞周期の調節、代謝調節等に関与しており、細胞調節機構として重要である。このようなタンパク質の調節機構を研究するため、未修飾のタンパク質と修飾されたタンパク質とを分離・精製する手法の開発が求められている。

ここで、ハイドロキシアパタイトは、生体親和性に優れることから、従来から、タンパク質等を吸着・分離する液体クロマトグラフィー用カラム（吸着装置）に使用する吸着剤として広く利用されている（例えば、特開平9-175805号公報参照）。

ところが、ハイドロキシアパタイト製の吸着剤は、各種タンパク質を非特異的に吸着してしまい、特定のタンパク質を選択的に吸着させることが困難であるという問題があり、前述したような未修飾のタンパク質と修飾されたタンパク質とを分離・精製する目的での使用には適さない。

発明の開示

本発明は、上記問題点に鑑みなされたもので、その目的は、目的とする化合物を特異的に吸着し得る吸着剤、目的とする化合物を、容易かつ確実に分離・精製することができる吸着装置、および、かかる吸着装置を容易かつ短時間で製造すること

ができる吸着装置の製造方法を提供することにある。

上記目的を達成するために、本発明は、少なくとも表面付近が $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6((\text{OH})_{1-x}\text{A}_x)_2$ [ただし、Aはハロゲン元素を示し、 $0 \leq x \leq 1$ である] で表されるアパタイトで構成され、前記アパタイトが有するリン酸基に、3価の金属イオンが結合してなることを特徴とする吸着剤に関する。

このような構成により、3価の金属イオンに対して高い親和性（高い結合力）で結合し得る部分を有する化合物（目的とする化合物）が、特異的に吸着するようになる。

本発明では、前記3価の金属イオンは、 Fe^{3+} であることが好ましい。これは、 Fe^{3+} は、リン酸基との結合能（親和性）に極めて優れているからである。

また、前記3価の金属イオンの結合量は、前記アパタイト1gに対して、0.1～100mgであることが好ましい。これにより、目的とする化合物の特異的吸着能が好適に発揮される。

また、本発明の吸着剤は、リン酸基を有する化合物を吸着するのに適している。これは、リン酸基が3価の金属イオンとの間に配位結合を形成（キレートを形成）するため、リン酸基を有する化合物は、特に強固に吸着剤に吸着されるからである。

この場合、前記化合物は、リン酸化タンパク質であることが好ましい。リン酸化タンパク質は、タンパク質自体がアパタイトへの吸着性が高いことから、極めて高い選択性をもって吸着される。

また、本発明では、前記Aは、フッ素元素であることが好ましい。これにより、アパタイト（吸着剤）の耐久性および耐溶剤性（特に耐酸性）をより向上させることができる。

また、本発明では、前記xは、0.3～1であることが好ましい。xが小さ過ぎると、ハロゲン元素Xの種類等によっては、吸着剤の耐久性や耐溶剤性を十分に向上させることができないおそれがあるからである。

本発明の他の態様は、カラムの吸着剤充填空間に、上述した吸着剤が充填されてなることを特徴とする吸着装置に関する。このような吸着装置によれば、3価の金属イオンに対して高い親和性（高い結合力）で結合し得る部分を有する化合物（目的とする化合物）を、容易かつ確実に分離・精製すること、すなわち、高収率かつ

高純度で回収することができる。

この場合、前記吸着剤が前記吸着剤充填空間にほぼ満量充填されていることが好ましい。このような構成により、目的とする化合物の分離・精製能をより向上させることができる。

また、前記吸着剤は、前記吸着剤充填空間の各部において、ほぼ同一の組成をなしていることが好ましい。これにより、目的とする化合物の分離・精製能が特に優れたものとなる。

また、前記吸着剤は、粒状をなしていることが好ましい。このように吸着剤を粒状とすることにより、その表面積を増大させることができ、目的とする化合物の吸着量をより増大させることができる。

また、粒状の前記吸着剤は、その平均粒径が $0.5 \sim 100 \mu\text{m}$ であることが好ましい。このような平均粒径の吸着剤を用いることにより、吸着装置がフィルタ部材を備える場合、フィルタ部材の目詰まりを確実に防止しつつ、吸着剤の表面積を十分に確保することができる。

本発明のさらに別の態様は、カラムの吸着剤充填空間に、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6((\text{OH})_{1-x}\text{A}_x)_2$ [ただし、Aはハロゲン元素を示し、 $0 \leq x \leq 1$ である] で表されるアパタイトを充填した状態で、前記吸着剤充填空間に、3価の金属イオンを含む溶液を通液することにより、前記アパタイトが有するリン酸基に、3価の金属イオンを結合させることを特徴とする吸着装置の製造方法に関する。この吸着剤の製造方法によれば、容易かつ短時間で、吸着装置を製造することができる。

この場合、前記3価の金属イオンを含む溶液1 L中における前記3価の金属イオンの含有量は、前記アパタイト1 molに対して、 $1 \sim 50 \text{ mol}$ であることが好ましい。これにより、アパタイトが有するリン酸基に3価の金属イオンを効率よく結合させることができる。

また、前記3価の金属イオンを含む溶液の総通液量は、 $1 \sim 50 \text{ mL}$ であることが好ましい。これにより、アパタイトが有するリン酸基に3価の金属イオンを効率よく結合させることができる。

また、前記3価の金属イオンを含む溶液の通液速度は、 $0.1 \sim 10 \text{ mL/min}$ であることが好ましい。これにより、アパタイトが有するリン酸基に3価の金属

イオンを効率よく結合させることができる。

上述したまたはそれ以外の本発明の目的、構成および効果は、図面を参照して行う以下の実施形態の説明からより明らかとなるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の吸着装置の実施形態を示す縦断面図である。

図2は、実施例1において、ハイドロキシアパタイト粉末が有するリン酸基への Fe^{3+} の結合の程度を確認する際に、分取した FeCl_3 溶液の各画分の Fe 濃度の変化を示すグラフである。

図3は、実施例1の吸着装置におけるオバルブミンの溶出パターンを示すグラフである。

図4は、比較例の吸着装置におけるオバルブミンの溶出パターンを示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の吸着剤、吸着装置および吸着装置の製造方法の好適な実施形態について詳細に説明する。

図1は、本発明の吸着剤を吸着装置に適用した場合の実施形態を示す縦断面図である。なお、以下の説明では、図1中の上側を「流入側」、下側を「流出側」と言う。

ここで、流入側とは、目的とする化合物を分離・精製する際に、例えば試料、溶出液等の液体を、本発明の吸着装置に供給する側のことを言い、一方、流出側とは、前記流入側と反対側、すなわち、前記液体が本発明の吸着装置から流出する側のことを言う。

図1に示す吸着装置1は、カラム2と、粒状の吸着剤3と、2枚のフィルタ部材4、5とを有している。

カラム2は、カラム本体21と、このカラム本体21の流入側端部および流出側端部に、それぞれ装着されるキャップ（蓋体）22、23とで構成されている。

カラム本体21は、例えば円筒状の部材で構成されている。カラム本体21を含

めカラム2を構成する各部（各部材）の構成材料としては、例えば、各種ガラス材料、各種樹脂材料、各種金属材料、各種セラミックス材料等が挙げられる。

カラム本体21には、その流入側開口および流出側開口を、それぞれ塞ぐようにフィルタ部材4、5を配置した状態で、その流入側端部および流出側端部に、それぞれキャップ22、23が螺合により装着される。

このような構成のカラム2では、カラム本体21と各フィルタ部材4、5とにより、吸着剤充填空間20が画成されている。そして、この吸着剤充填空間20に吸着剤3が充填されている。

また、カラム本体21に各キャップ22、23を装着した状態で、これらの間の液密性が確保されるように構成されている。

各キャップ22、23のほぼ中央には、それぞれ、流入管24および流出管25が液密に固着（固定）されている。この流入管24およびフィルタ部材4を介して吸着剤3に、例えば試料、溶出液等の液体が供給される。また、吸着剤3に供給された液体は、吸着剤3同士の間（間隙）を通過して、フィルタ部材5および流出管25を介して、カラム2外へ流出する。このとき、試料に含まれる各成分（化合物）は、吸着剤3に対する吸着性の差異に基づいて相互に分離される。

各フィルタ部材4、5は、それぞれ、吸着剤充填空間20から吸着剤3が流出するのを防止する機能を有するものである。これらのフィルタ部材4、5は、それぞれ、例えば、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリエーテルポリアミド、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート等の合成樹脂からなる不織布、発泡体（連通孔を有するスポンジ状多孔質体）、織布、メッシュ等、あるいは、ステンレス鋼のような金属材料からなるメッシュ等で構成されている。

さて、本発明では、吸着剤充填空間20に充填された吸着剤3の構成に特徴を有する。以下、この点（特徴）について詳述する。

本発明の充填剤3は、その少なくとも表面付近が $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6((\text{OH})_{1-x}\text{A}_x)_2$ [ただし、Aはハロゲン元素を示し、 $0 \leq x \leq 1$ である] で表されるアパタイトで構成され、このアパタイトが有するリン酸基に、3価の金属イオンが結合してなるものである。

なお、3価の金属イオンは、リン酸基に対して1対1で結合（イオン結合）していてもよく、複数のリン酸基に結合（配位結合）していてもよい。

このような構成により、3価の金属イオンに対して高い親和性（高い結合力）で結合し得る部分を有する化合物が、特異的に吸着剤3に吸着するようになる。

ここで、3価の金属イオンに対して特異的に吸着（結合）する化合物としては、リン酸基を有するものが挙げられる。このものは、リン酸基が3価の金属イオンとの間に配位結合を形成（キレートを形成）する。この結合は、通常の吸着（電気的な結合）より強固なものとなるため、本発明の吸着剤3を用いることにより、吸着装置1は、前記化合物を確実に吸着させ、他の化合物と相互に分離して、精製すること（単離すること）ができる。

また、リン酸基を有する化合物には、各種のものがあるが、特に、リン酸化タンパク質は、タンパク質自体がアパタイトへの吸着性が高いことから、極めて高い選択性をもって、本発明の吸着剤3に吸着される。

3価の金属イオンとしては、例えば、 Fe^{3+} 、 Sc^{3+} 、 Y^{3+} 、 La^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Pr^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Pm^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Gd^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Er^{3+} 、 Tm^{3+} 、 Yb^{3+} 、 Lu^{3+} 、 Ac^{3+} 、 Pu^{3+} 、 Am^{3+} 、 Cm^{3+} 、 Bk^{3+} 、 Cf^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Rh^{3+} 、 Al^{3+} 、 Ga^{3+} 、 In^{3+} 、 Tl^{3+} 、 Sb^{3+} 、 Bi^{3+} 等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせ用いることができる。これらの3価の金属イオンは、いずれも、安定して存在し得ることから好ましい。

これらの中でも、3価の金属イオンとしては、特に、 Fe^{3+} が好適である。 Fe^{3+} は、リン酸基との結合能（親和性）に極めて優れる。このため、3価の金属イオンとして Fe^{3+} を用いることにより、吸着剤3は、その吸着能が長期に亘って維持（保持）されるとともに、リン酸基を有する化合物（特に、リン酸化タンパク質）の特異的吸着能が極めて高いものとなる。

このような3価の金属イオンは、前述したような化合物の特異的吸着能が好適に発揮される程度に、前記アパタイトに結合していればよく、その結合量は、特に限定されないが、アパタイト1gに対して、0.1～100mg程度であるのが好ましく、0.5～25mg程度であるのがより好ましい。

また、前記組成式で表されるアパタイトは、水酸基が無置換のものであってもよいが、その少なくとも一部がハロゲン基（ハロゲン元素A）で置換されているのが好ましい。これにより、アパタイトを構成する各元素（イオン）の間の結合力が増大し、アパタイト（吸着剤3）の耐久性および耐溶剤性（特に耐酸性）を向上させることができる。

前記ハロゲン元素Aは、F（フッ素元素）が好適である。フッ化物イオンは、他のハロゲン化物イオンと比較して、電気陰性度が高いため、水酸基の少なくとも一部をフルオロ基で置換することにより、前記効果をより向上させることができる。

前記組成式中のx、すなわち、ハロゲン元素Aの置換率も、できるだけ大きい方が好ましく、特に限定されるものではないが、0.3～1程度であるのが好ましく、0.5～1程度であるのがより好ましい。前記xが小さ過ぎると、ハロゲン元素Aの種類等によっては、吸着剤3の耐久性や耐溶剤性を十分に向上させることができないおそれがある。

以上のような吸着剤3の形態（形状）は、図1に示すように、粒状（顆粒状）のものであるのが好ましいが、その他、例えばペレット状（小塊状）、ブロック状（例えば、隣接する空孔同士が互いに連通する多孔質体、ハニカム形状）等とすることもできる。吸着剤3を粒状とすることにより、その表面積を増大させることができ、前述した化合物の吸着量をより増大させることができる。

粒状の吸着剤3の平均粒径は、特に限定されないが、0.5～100 μ m程度であるのが好ましく、10～40 μ m程度であるのがより好ましい。このような平均粒径の吸着剤3を用いることにより、前記フィルタ部材5の目詰まりを確実に防止しつつ、吸着剤3の表面積を十分に確保することができる。

なお、吸着剤3は、その全体が前記組成式で表されるアパタイトで構成されたものであってもよく、その表面付近のみが前記組成式で表されるアパタイトで構成されたものであってもよい。

また、本発明の吸着装置1では、カラム2の吸着剤充填空間20の一部にのみ吸着剤3が充填されているものであってもよいが、図1に示すように、吸着剤充填空間20に吸着剤3がほぼ満量充填されているのが好ましい。このような構成により、例えば、吸着剤充填空間20の一部にのみ吸着剤3を充填し、残りの部分にハイド

ロキシアパタイトで構成される吸着剤を充填した構成の吸着装置等と比較して、前述した化合物の分離・精製能をより向上させることができる。

さらに、吸着剤 3 は、吸着剤充填空間 20 の各部において、ほぼ同一の組成をなしているのが好ましい。これにより、吸着装置 1 は、前述した化合物の分離・精製能が特に優れたものとなる。

このような吸着装置 1 は、例えばカラム 2 の吸着剤充填空間 20 に、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6((\text{OH})_{1-x}\text{A}_x)_2$ [ただし、A はハロゲン元素を示し、 $0 \leq x \leq 1$ である] で表されるアパタイト粉体を充填した状態で、吸着剤充填空間 20 に、3 価の金属イオンを含む溶液を通液する方法により製造することができる。

かかる方法によれば、容易かつ短時間で、吸着剤 3 を得て、吸着装置 1 を製造することができる。

また、本発明の吸着装置 1 では、前述したように、吸着剤 3 は、そのほぼ全てが同一の構成（特に、吸着剤充填空間 20 の各部において、ほぼ同一の組成）とされているのが好ましいが、前記の方法を用いることにより、吸着剤 3 の構成（組成）にバラツキが生じるのを防止することができるという利点もある。

この方法において、前記溶液 1 L 中における 3 価の金属イオンの含有量（濃度）は、吸着剤充填空間 20 に充填されたアパタイト粉体 1 mol に対して、1～50 mol 程度であるのが好ましく、5～30 mol 程度であるのがより好ましい。含有量が少な過ぎると、用いる溶液量が増大すること等により、アパタイト粉体に 3 価の金属イオンを結合させるのに要する時間が必要以上に長くなるおそれがあり、一方、含有量を前記上限値を超えて多くしても、それ以上の 3 価の金属イオンの吸着量の増大が期待できない。

前記溶液の総通液量は、特に限定されないが、3 価の金属イオンの含有量を前記範囲とする場合、1～50 mL 程度であるのが好ましく、5～30 mL 程度であるのがより好ましい。総通液量が少な過ぎると、3 価の金属イオンの含有量等によっては、アパタイト粉体への 3 価の金属イオンの吸着が十分に行われない場合があり、一方、総通液量を前記上限値を超えて多くしても、アパタイト粉体に 3 価の金属イオンを結合させるのに要する時間が必要以上に長くなるだけで、それに見合った吸着量の増大は見込めない。

また、前記溶液の通液速度は、 $0.1 \sim 10 \text{ mL/min}$ 程度であるのが好ましく、 $1 \sim 5 \text{ mL/min}$ 程度であるのがより好ましい。通液速度が遅過ぎると、アパタイト粉体に3価の金属イオンを結合させるのに要する時間が必要以上に長くなり、一方、通液速度が速過ぎると、3価の金属イオンの含有量等によっては、アパタイト粉体への3価の金属イオンの吸着が十分に行われない場合がある。

このような方法によれば、前記溶液の条件（イオンの含有量、総通液量、通液速度）を適宜設定することにより、アパタイト粉体への3価の金属イオンの結合量を、所望のものにコントロールすることができる。

また、この方法において、前記溶液の通液方向は、任意である。すなわち、例えば、前記溶液を、連続的または間欠的に、流入側から流出側に向う一方向にのみ吸着剤充填空間20に通液することができ、また、所定量の前記溶液を流入側から流出側に向かって吸着剤充填空間20に通液した後、通液方向を変更し、所定量の前記溶液を吸着剤充填空間20に通液することができる。また、後者の場合、このような通液操作を、複数回繰り返して行ってもよい。

なお、前記溶液としては、3価の金属イオンを含むものであれば、いかなるものを用いてもよいが、例えば、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物のようなハロゲン化物、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、水酸化物等の溶液を用いることができる。

次に、本発明の吸着装置の使用方法の一例について、リン酸化タンパク質を分離・精製する場合を代表に説明する。

まず、試料として、リン酸化タンパク質およびリン酸化されていないタンパク質の複数種のタンパク質を緩衝液に溶解した溶液を用意する。そして、この試料を、流入管24およびフィルタ部材4を介して吸着剤3に供給して、カラム2内を通過させる。これにより、吸着剤3に吸着しない成分（リン酸化されていないタンパク質）は、フィルタ5および流出管25を介してカラム2内から流出し、吸着剤3に選択的に吸着した成分（リン酸化タンパク質）は、カラム2内に保持される。

ここで、緩衝液には、例えば、リン酸緩衝液、Tris-HCl緩衝液、Good buffer等を用いることができる。

次に、流入管24からカラム2内へ溶出液を供給し、カラム2の流出管25から流出する溶出液を採取する。

この溶出液には、吸着剤 3 に吸着したリン酸化タンパク質よりも吸着剤 3 に対する吸着能が高い物質（競合試薬）、キレート剤等を含有する緩衝液、前記緩衝液より塩濃度の高い緩衝液、前記緩衝液より pH の低い（pH 5.5～10 程度）の緩衝液等を用いることができる。また、溶出液は、溶質の濃度を経時的に変化させつつカラム 2 内へ供給（吸着剤充填空間 20 に通液）するようにしてもよい。

吸着剤 3 に溶出液が接触すると、吸着剤 3 に選択的に吸着したリン酸化タンパク質は、吸着剤 3 から離脱して、溶出液中に混入する。

以上、本発明の吸着剤、吸着装置および吸着装置の製造方法について説明したが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例

次に、本発明の具体的実施例について説明する。

1. 吸着装置の製造

以下に示す実施例 1、2 および比較例の吸着装置をそれぞれ 5 個ずつ製造した。

（実施例 1）

公知の湿式合成法によりハイドロキシアパタイトを合成し、ハイドロキシアパタイトスラリーを得た。

このハイドロキシアパタイトスラリーを噴霧乾燥して、平均粒径 $40\ \mu\text{m}$ の粉体を得た。その後、この粉体を、大気中、 $700^\circ\text{C} \times 4$ 時間で焼成した。

このハイドロキシアパタイト粉体を、 $10\ \text{mM}$ リン酸緩衝液に懸濁させ、カラム（内径 $4\ \text{mm} \times$ 長さ $100\ \text{mm}$ ）の吸着剤充填空間に充填した。なお、2 枚のフィルタ部材として、開口径（平均） $2\ \mu\text{m}$ のステンレスメッシュを用いた。

また、吸着剤充填空間に充填されたハイドロキシアパタイト粉体の量は、 $0.7\ \text{g}$ （約 $0.7\ \text{mmol}$ ）であった。

次に、カラム内に流入管から $10\ \text{mM}$ の FeCl_3 溶液を流速 $1\ \text{mL}/\text{min}$ で 10 分間供給し、ハイドロキシアパタイト粉体が有するリン酸基に Fe^{3+} を結合させた。これにより、吸着剤を得て、吸着装置を製造した。

ここで、ハイドロキシアパタイト粉末が有するリン酸基への Fe^{3+} の結合の程度は、次のようにして確認した。

すなわち、前記ハイドロキシアパタイト粉体が有するリン酸基に Fe^{3+} を結合させる工程において、流出管から流出する FeCl_3 溶液を1分毎に分取し、各画分の Fe 濃度を測定した。

次に、カラム内に流入管から、洗浄液として、10mMリン酸緩衝液を供給して吸着剤を洗浄して、カラム内から Fe の溶出がなくなったことを確認した後、再度、10mMの FeCl_3 溶液を、流速1mL/minで10分間供給し、流出管から流出する FeCl_3 溶液を1分毎に分取し、各画分の Fe 濃度を測定した。

なお、この Fe 濃度の測定は、原子吸光装置（島津製作所社製、「AA-6200」）を用いて原子吸光法により行なった。

以上2回の FeCl_3 溶液の通液操作で、分取した FeCl_3 溶液における各画分の Fe 濃度の測定結果を、それぞれ図2に示す。なお、図2には、カラム内から流出した洗浄液中の Fe 濃度の測定結果も併せて示した。

図2に示すように、1回目より2回目の FeCl_3 溶液の通液操作において、カラムから流出する FeCl_3 溶液中の Fe 濃度が高くなっている。これは、1回目の FeCl_3 溶液の通液操作で Fe^{3+} がハイドロキシアパタイト粉体が有するリン酸基に結合し、2回目の FeCl_3 溶液の通液操作において Fe^{3+} が結合し得るリン酸基の数が減少していることが原因であると推察される。

この結果は、 FeCl_3 溶液の通液操作により、ハイドロキシアパタイト粉体の表面のリン酸基に、容易に Fe^{3+} が結合し得ることを示唆するものである。

また、原子吸光装置（島津製作所社製、「AA-6200」）を用いて、粉体の Fe 量を測定した結果、吸着剤1gあたり2.9mgの Fe^{3+} が結合していることが確認された。

（実施例2）

公知の湿式合成法によりフッ素アパタイト（ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ）を合成し、フッ素アパタイトスラリーを得た。

このフッ素アパタイトスラリーを噴霧乾燥して、平均粒径40 μm の粉体を得た。その後、この粉体を、大気中、700℃×4時間で焼成した。

このフッ素アパタイト粉体1g（約1mmol）を用いて、前記実施例1と同様にして、吸着装置を製造した。

なお、前記実施例 1 で示した元素分析法により、Fe 量を測定した結果、吸着剤 1 g あたり 2.9 mg の Fe^{3+} が結合していることが確認された。

(比較例)

FeCl_3 溶液の通液操作を省略した以外は、前記実施例 1 と同様にして、吸着装置を製造した。

2. 評価

2-1. リン酸化タンパク質の吸着特性

以下に示すようにして、実施例 2 および比較例で製造した吸着装置について、それぞれ、リン酸化タンパク質の吸着特性を調べた。

まず、吸着装置のカラム内の液体を、10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に置き換えた。

次に、リン酸化されていないオバルブミン (非リン酸化オバルブミン)、リン酸基を 1 つまたは 2 つ有するオバルブミン (リン酸化オバルブミン) を、それぞれ、50 mg/mL となるように、前記と同様のリン酸緩衝液に溶解した試料 2 mL をカラム内に供給して、カラム内を通過させた。

次に、10 mM から 300 mM まで 15 分でリン酸緩衝液のグラジエントをかけ、リン酸緩衝液の濃度を上げていった。なお、リン酸緩衝液の流速 (flow rate) は、1 mL/min とした。そして、2 種類のオバルブミンが、カラム内からそれぞれ溶出を開始する時間 (retention time) を 280 nm の UV モニターで測定 (確認) した。

その結果を表 1 に示す。なお、表 1 中の数値は、実施例 2 および比較例において、それぞれ、5 個の吸着装置における平均値である。

表 1

	溶出開始時間 (retension time)	
	リン酸化	非リン酸化
実施例 2	5 分 4 0 秒	1 分 3 0 秒
比較例	5 分 2 0 秒	4 分 3 0 秒

表 1 に示すように、実施例 2 の吸着装置は、比較例の吸着装置に比べて、リン酸化されていないオバルブミン（非リン酸化オバルブミン）の溶出開始時間が明らかに速いものであった。

すなわち、実施例 2 の吸着装置では、比較例の吸着装置に比べて、リン酸化されたオバルブミン（リン酸化オバルブミン）とリン酸化されていないオバルブミン（非リン酸化オバルブミン）との分離度の向上が図られた。

また、実施例 2 の吸着装置から回収されたリン酸緩衝液中には、 Fe^{3+} の溶出は、ほとんど認められなかった。

2-2. リン酸化タンパク質の分離特性

以下に示すようにして、実施例 1 および比較例で製造した吸着装置について、それぞれ、リン酸化タンパク質の分離特性を調べた。

実施例 1 および比較例の吸着装置を、それぞれ高速液体クロマトグラフィー（Bio-Rad 社製、「Duo-flow」）に取り付け、カラム内の液体を 1 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.8）に置き換えた。

次に、オバルブミン（sigma 社製）を 5 mg/mL となるように、前記 Tris-HCl 緩衝液に溶解して試料溶液を調製した。なお、このオバルブミンは、リン酸化されたものとリン酸化されていないものの混合物である。

次に、この試料溶液 50 μL を、高速液体クロマトグラフィーに注入した。溶出液は、前記 Tris-HCl 緩衝液と 10 mM のリン酸ナトリウム緩衝液との混合比が、15 分間で 100 : 0 ~ 0 : 100 となるように経時的に変化させた。なお、溶出液の流速は 1 mL/分とした。

そして、カラム内から流出する溶出液中へのオバルブミンの溶出パターンを調べた。

図3には、実施例1の吸着装置におけるオバルブミンの溶出パターンを、図4には、比較例の吸着装置におけるオバルブミンの溶出パターンを、それぞれ示す。

図3に示すように、実施例1の吸着装置では、リン酸化されたオバルブミン（リン酸化オバルブミン）に対する特異的な吸着が生じ、リン酸化されていないオバルブミン（非リン酸化オバルブミン）は、早期にカラム内から溶出された。

これに対して、図4に示すように、比較例の吸着装置では、リン酸基を有するオバルブミンと有さないオバルブミンとの明確な分離が得られず、リン酸基の有無にかかわらず、オバルブミンを非特異的に吸着した。

なお、実施例2の吸着装置を用いた場合も、前記実施例1の溶出パターンと同様の溶出パターンであった。

以上のように、各実施例（本発明）の吸着装置は、リン酸化されたオバルブミン（リン酸化タンパク質）に対する特異的吸着能に優れるため、リン酸化タンパク質の分離・精製に好適に使用することができる。

産業上の利用可能性

以上述べたように、本発明によれば、3価の金属イオンをアパタイトが有するリン酸基に結合させたことにより、3価の金属イオンに対して親和性を有する化合物（目的とする化合物）を、高収率かつ高純度で回収することができる。

また、3価の金属イオンの種類を適宜選択することにより、分離・精製を目的とする化合物の種類を選択することができる。例えば、3価のイオンとして、 Fe^{3+} を選択することにより、例えばリン酸化タンパク質等のリン酸基を有する化合物に対する特異的吸着能を向上させることができる。

なお、本件出願は、日本国特許願2003-164336に基づくものであり、当該出願の番号を明記することにより、その開示内容全体が本件出願に組み込まれたものとする。

請求の範囲

1. 少なくとも表面付近が $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6((\text{OH})_{1-x}\text{A}_x)_2$ [ただし、Aはハロゲン元素を示し、 $0 \leq x \leq 1$ である] で表されるアパタイトで構成され、前記アパタイトが有するリン酸基に、3価の金属イオンが結合してなることを特徴とする吸着剤。
2. 前記3価の金属イオンは、 Fe^{3+} である請求の範囲第1項に記載の吸着剤。
3. 前記3価の金属イオンの結合量は、前記アパタイト1gに対して、0.1～100mgである請求の範囲第1項または第2項に記載の吸着剤。
4. リン酸基を有する化合物を吸着する請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の吸着剤。
5. 前記化合物は、リン酸化タンパク質である請求の範囲第4項に記載の吸着剤。
6. 前記Aは、フッ素元素である請求の範囲第1項ないし第5項のいずれかに記載の吸着剤。
7. 前記xは、0.3～1である請求の範囲第1項ないし第6項のいずれかに記載の吸着剤。
8. カラムの吸着剤充填空間に、請求の範囲第1項ないし第7項のいずれかに記載の吸着剤が充填されてなることを特徴とする吸着装置。
9. 前記吸着剤は、前記吸着剤充填空間に、ほぼ満量充填されている請求の範囲第8項に記載の吸着装置。

10. 前記吸着剤は、前記吸着剤充填空間の各部において、ほぼ同一の組成をなしている請求の範囲第8項または第9項に記載の吸着装置。

11. 前記吸着剤は、粒状をなしている請求の範囲第8項ないし第10項のいずれかに記載の吸着装置。

12. 粒状の前記吸着剤は、その平均粒径が $0.5 \sim 100 \mu\text{m}$ である請求の範囲第11項に記載の吸着装置。

13. カラムの吸着剤充填空間に、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6((\text{OH})_{1-x}\text{A}_x)_2$ [ただし、Aはハロゲン元素を示し、 $0 \leq x \leq 1$ である] で表されるアパタイトを充填した状態で、前記吸着剤充填空間に、3価の金属イオンを含む溶液を通液することにより、前記アパタイトが有するリン酸基に、3価の金属イオンを結合させることを特徴とする吸着装置の製造方法。

14. 前記3価の金属イオンを含む溶液1L中における前記3価の金属イオンの含有量は、前記アパタイト1molに対して、 $1 \sim 50 \text{mol}$ である請求の範囲第13項に記載の吸着装置の製造方法。

15. 前記3価の金属イオンを含む溶液の総通液量は、 $1 \sim 50 \text{mL}$ である請求の範囲第13項または第14項に記載の吸着装置の製造方法。

16. 前記3価の金属イオンを含む溶液の通液速度は、 $0.1 \sim 10 \text{mL/min}$ である請求の範囲第13項ないし第15項のいずれかに記載の吸着装置の製造方法。

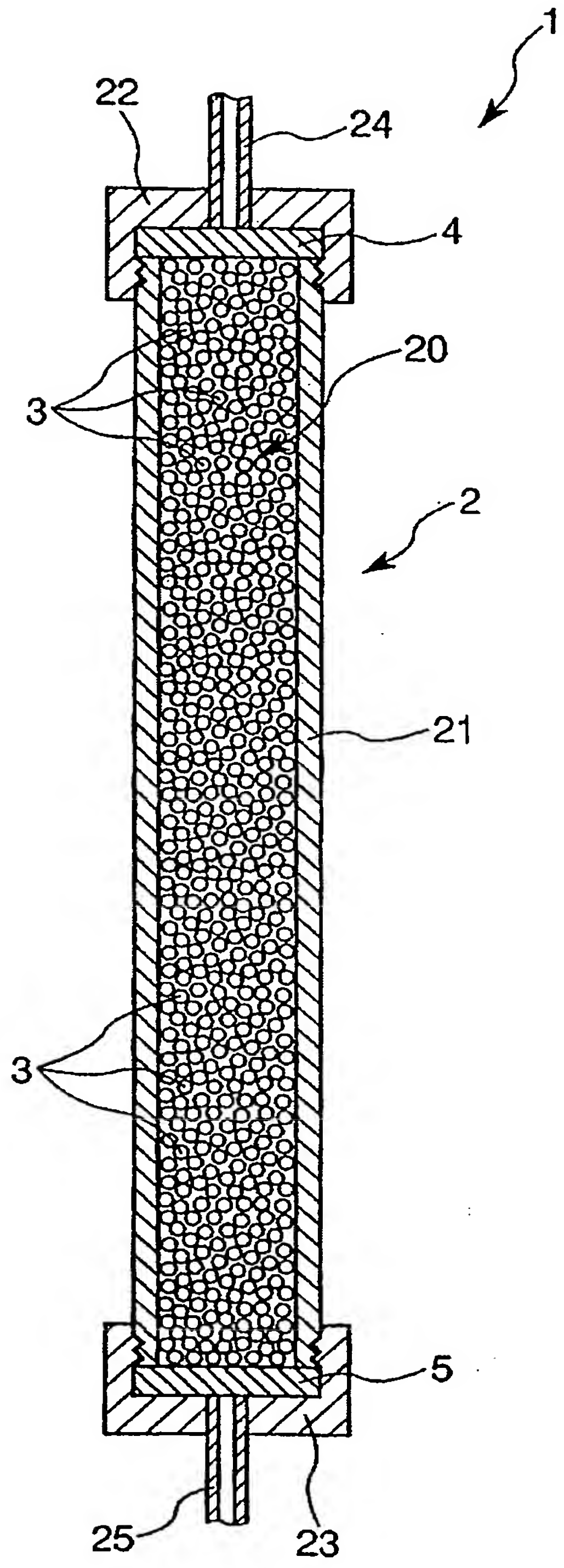


Fig. 1

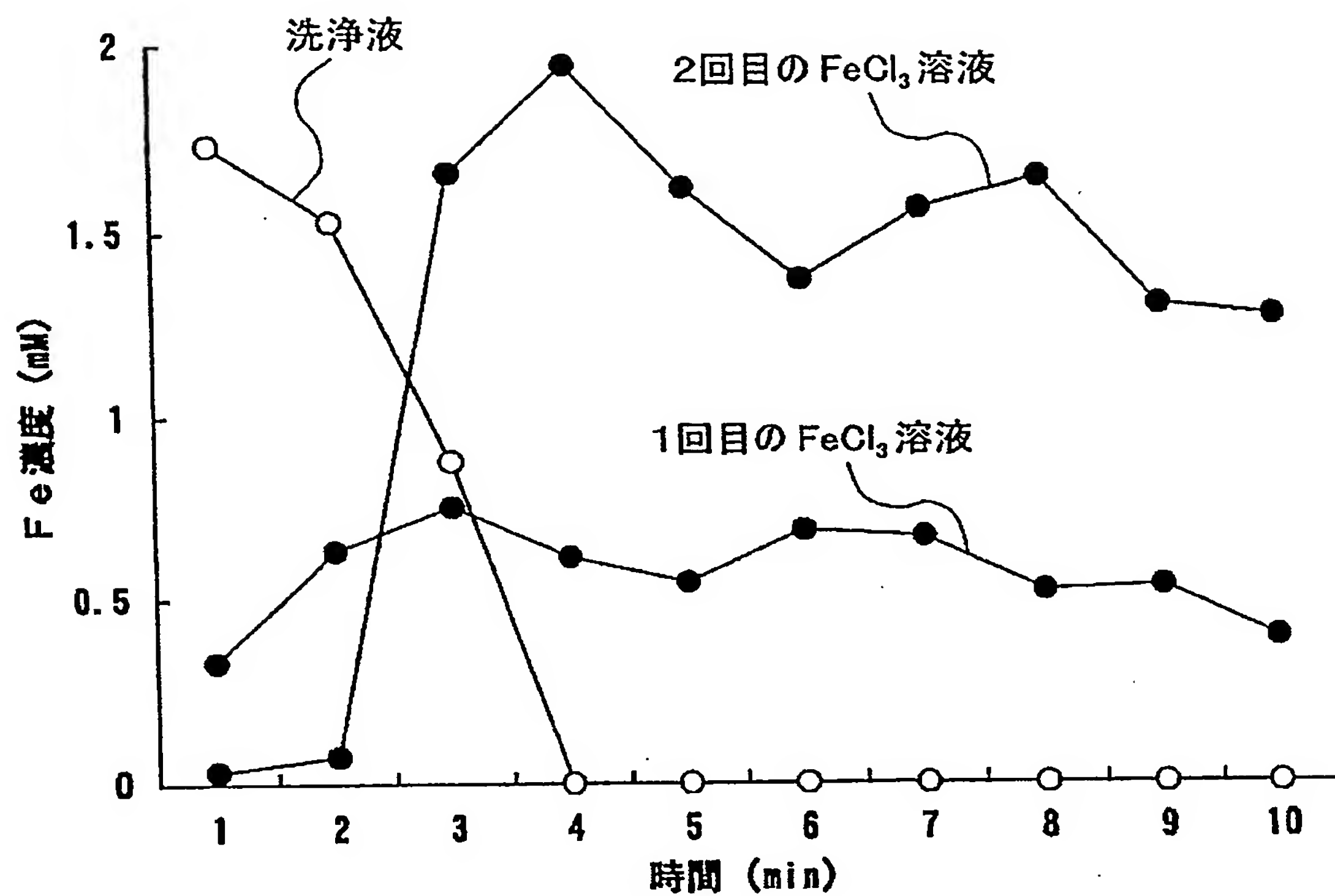


Fig. 2

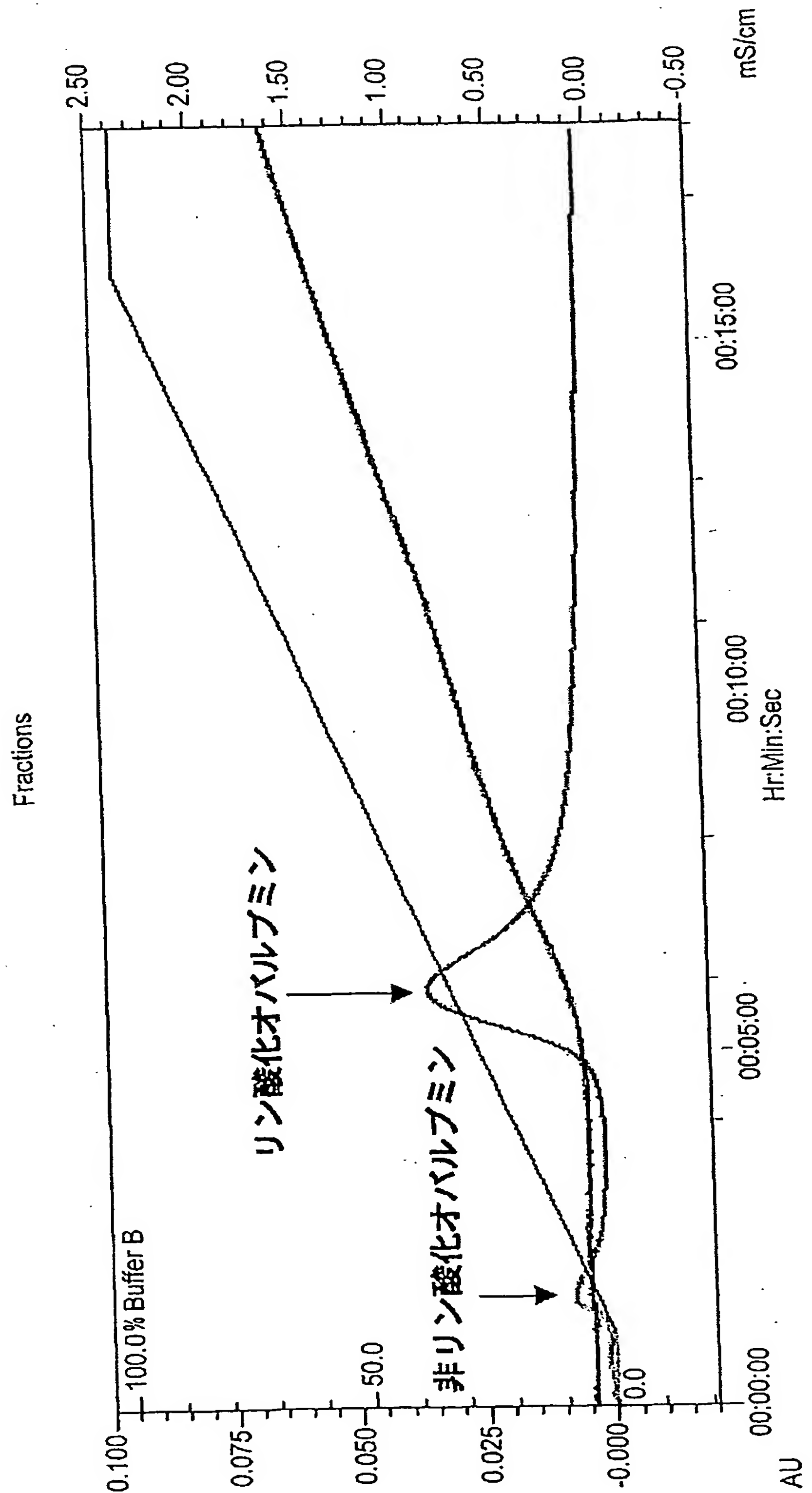


Fig. 3

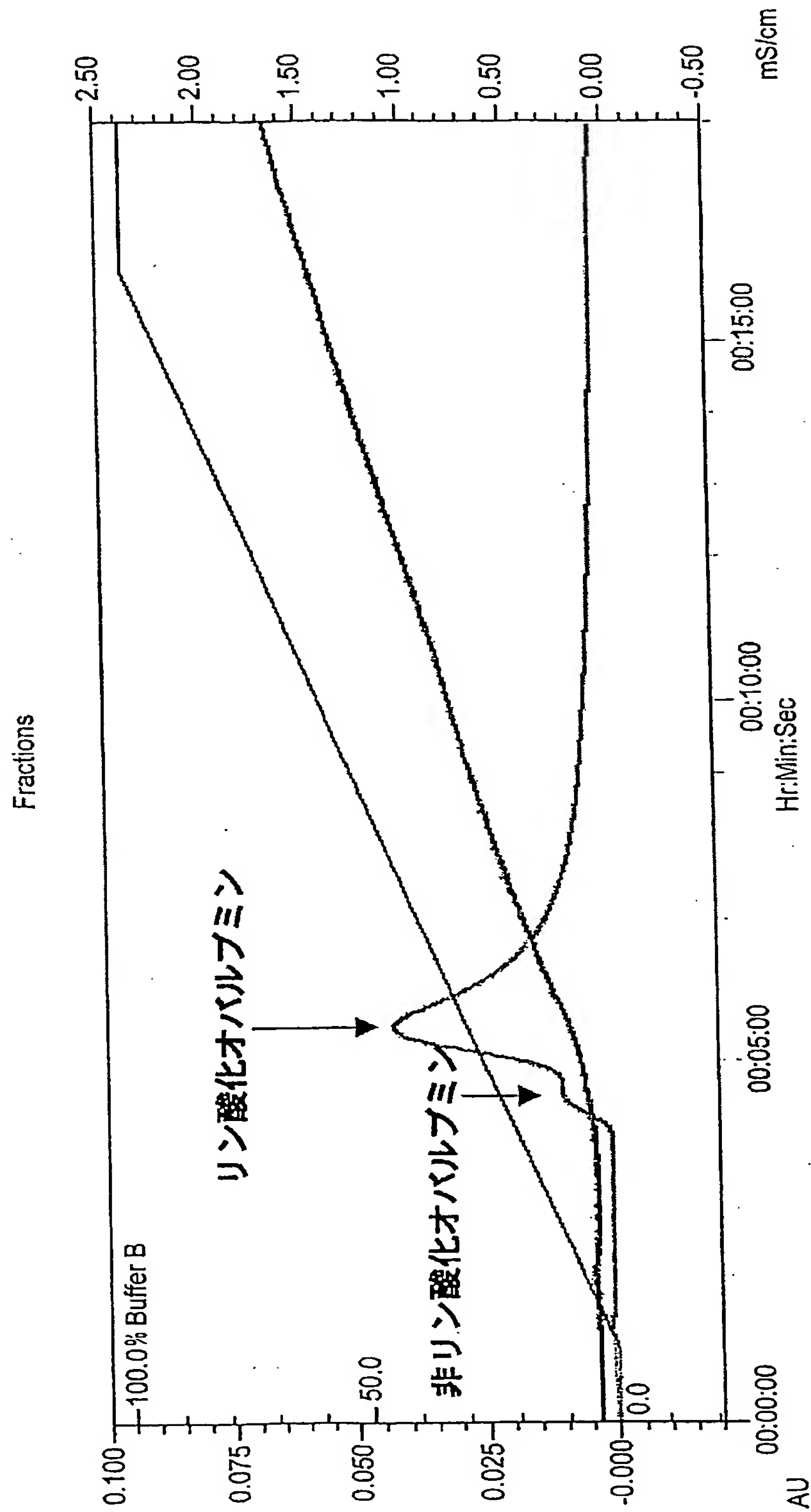


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ B01J20/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ B01J20/00-20/04, B01D15/08, G01N30/48, C01B25/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 10-118167 A (Sangi Co., Ltd.), 12 May, 1998 (12.05.98), Claims; Par. Nos. [0020], [0027] to [0032], [0057]; examples (Family: none)	1-3, 6, 7 4, 5
X A	JP 7-96175 A (Tosoh Corp.), 11 April, 1995 (11.04.95), Claims; Par. Nos. [0008], [0011], [0014] to [0016] (Family: none)	1-3 4-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 July, 2004 (27.07.04)Date of mailing of the international search report
10 August, 2004 (10.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008364

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 3-16906 A (The Nippon Chemical Industrial Co., Ltd.), 24 January, 1991 (24.01.91), Claims; page 3, upper right column; page 5, lower right column; examples (Family: none)	1, 3, 6-12 2, 4, 5, 13-16
A	JP 2-237639 A (Rasa Industries, Ltd.), 20 September, 1990 (20.09.90), Claims; page 2, upper right column to lower left column (Family: none)	1-7
A	JP 1-155263 A (Asahi Optical Co., Ltd.), 19 June, 1989 (19.06.89), Claims; page 2, upper left column to upper right column & EP 320849 A1	1-16
A	JP 1-297553 A (Asahi Optical Co., Ltd.), 30 November, 1989 (30.11.89), Claims; page 2, upper right column to lower left column (Family: none)	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ B01J20/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ B01J20/00-20/04, B01D15/08, G01N30/48, C01B25/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2004年

日本国実用新案登録公報 1996-2004年

日本国登録実用新案公報 1994-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	J P 10-118167 A (株式会社サンギ) 1998. 0 5. 12, 特許請求の範囲, 【0020】, 【0027】~【00 32】, 【0057】, 実施例 (ファミリーなし)	1-3, 6, 7 4, 5
X A	J P 7-96175 A (東ソー株式会社) 1995. 04. 1 1, 特許請求の範囲, 【0008】, 【0011】, 【0014】 ~【0016】 (ファミリーなし)	1-3 4-7
X	J P 3-16906 A (日本化学工業株式会社) 1991. 0 1. 24, 特許請求の範囲, 第3頁右上欄, 第5頁右下欄, 実施例	1, 3, 6- 12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 07. 2004

国際調査報告の発送日

10. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

柴田 昌弘

4Q

9842

電話番号 03-3581-1101 内線 3467

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	(ファミリーなし)	2, 4, 5, 13-16
A	J P 2-237639 A (ラサ工業株式会社) 1990. 0 9. 20, 特許請求の範囲, 第2頁右上欄から左下欄 (ファミリー なし)	1-7
A	J P 1-155263 A (旭光学工業株式会社) 1989. 0 6. 19, 特許請求の範囲, 第2頁左上欄から右上欄 & E P 320849 A1	1-16
A	J P 1-297553 A (旭光学工業株式会社) 1989. 1 1. 30, 特許請求の範囲, 第2頁右上欄から左下欄 (ファミリー なし)	1-16